

動物衛生報導 第8期



行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 補助

雲林縣家畜疾病防治所編印

中華民國100年12月

GPN : 2009901542

強化畜禽動物疾病防治計畫

100管理-1.1-動防-01





新竹縣家畜疾病防治所病例報告

吳郭魚弗朗西斯氏菌症 (Francisellosis in Tilapia)

彭如賢、鄧晶瑩、彭泰康

報告日期：100年11月7日

一、前言

吳郭魚在臺灣養殖已超過60年，因其對病害的抵抗力及環境的適應力很強，加上成長快速、肉質細緻且無細刺，較能被一般消費者接受，因此是目前臺灣主要淡水養殖魚類之一，也是世界性重要養殖魚種。

本縣湖口鄉及新豐鄉因受地形限制，吳郭魚之飼養皆利用大型灌溉埤圳，與鱸、鯽、烏鰡及草魚等淡水魚混養，形成極具效益的立體式養殖，因此吳郭魚為本縣最大宗之養殖魚種。近年來受到天氣異常變化及水源品質不穩定，常在疾病感染時爆發大量死亡，其中又以弗朗西斯氏菌之感染最為嚴重，造成養殖業者鉅大之經濟損失。

吳郭魚弗朗西斯氏菌症是由*Francisella noatunensis subsp. orientalis*感染所引起的疾病。臺灣最早被發表的病例在1992年10月，記載吳郭魚被一種細胞內寄生微生物所感染的病例。弗朗西斯氏菌是一種兼性細胞內寄生的微生物，外型呈多形性球桿狀，與立克次體相同，必需用細胞培養，而無法以一般的培養基來培養分離，因此一直被誤認為是類立克次體 (*rickettsia-like organism*)。直到近年，因分子生物技術的進步，現在已重新釐清這些被混淆的微生物，將其重新定位而確認為*F. noatunensis subsp. orientalis*。如今吳郭魚感染弗朗西斯氏菌已遍及全臺各地，不論是淡水或鹹水養殖的吳郭魚都無法倖免。

二、病歷

本所自今年4月初即接獲新豐鄉及湖口鄉一帶埤圳養殖吳郭魚之異常死亡情形。業主敘述月初魚隻開始發病，每日皆有10-50尾不等的零星死亡，自行使用光合菌或換水都無法改善疫情。若無藥物控制，1-2週後即會出現大量死亡，可高達3-4,000斤。因附近養殖塘亦有相同情形，故請本所進一步瞭解病因，以求控制病情。現場訪視發現，發病埤圳皆屬光復圳之支線陂塘，上游池塘發病不久後，下一池塘亦有疫情發生，且其發病期似乎與季節有關，本所因此針對本病依月份、發病症狀及死亡情況，進行深入探討。

三、臨床症狀

消瘦、泳姿不正常、體色異常、脫鱗、皮膚糜爛或潰瘍、眼球突出、高死亡率等非特異性症狀。

四、肉眼病變

- 1.外觀：體色異常，鰓蓋、腹部、胸鰭基部或尾鰭基部充出血或潮紅，部分病魚體表有糜爛或潰瘍。
- 2.鰓(圖1)：鰓絲充血，黏液增厚，鰓絲上密發白色結節。
- 3.脾臟、腎臟(圖1、圖2)：腫大，密發大小不一白色結節。
- 4.肝臟(圖1)：散發大小不一白色結節。
- 5.心臟：心外膜散發大小不一白色結節。
- 6.胃腸道：部分魚隻黏膜下水腫，腸炎。

五、初步診斷

根據病史、臨床症狀及肉眼病變，初步懷疑為弗朗西斯氏菌症。

六、組織病變

- 1.鰓(圖4)：
多發壞死灶，病灶區可見大量吞噬細胞浸潤，並可見脫落壞死細胞混雜其間，二級鰓薄板因炎症細胞浸潤而融合。
- 2.脾臟、腎臟、肝臟、心臟、腸胃道(圖5、圖6)：

多發壞死性肉芽腫，病灶區中央可見壞死區，周圍由多層類上皮細胞、吞噬菌體的巨噬細胞及纖維母細胞所圍繞。

七、實驗室檢驗

1. 細菌培養：

自病魚之心臟、肝臟、脾臟及腎臟進行釣菌，培養於Blood Agar及MacConkey Agar，置於30 °C培養24小時，均無分離出弗朗西斯氏菌。同時另釣菌於特殊培養基Cystine Heart Agar、Chocolate Agar及Enriched medium，置於30 °C培養4至5天，亦無分離出弗朗西斯氏菌。

2. 濕壓片鏡檢 (圖3)：

自病魚鰓部剪取部分初級鰓薄板進行檢驗，可見病魚鰓部黏液增厚，在初級鰓薄板間可見多發類結節樣物，部分檢體伴隨有車輪蟲、錨蟲等寄生蟲感染。

3. 聚合酶鏈反應 (PCR)：

將採集之病魚臟器以商品化DNA純化套組萃取DNA，將所得之DNA作為PCR反應所需之模版。PCR反應所使用之引子是參考謝嘉裕博士2006年Study on Francisellosis in Chchlid fish中發表的序列。FLB種別特異引子對 (FLB species specific primers) 如下：

FLB-16S-180f：5'-GCGGATTAAAGGTGGCCTTTG-3'

FLB-16S-456r：5'-CCTGCAAGCTATTAACACAGG-3'

聚合酶鏈鎖反應程序如下：Initial denaturation為94 °C、10分鐘，Denaturation為94 °C、30秒，Annealing為58 °C、30秒，Extension為72 °C、30秒，進行35個循環，最後的Extension為72 °C、7分鐘。增幅之DNA產物其特異性片段大小約為286 bp。

將DNA產物以2 %瓊脂膠片於100伏特下進行電泳分析，並將陽性產物進行核酸定序。經NCBI之基因庫 (GeneBank) 比對，定序後之核苷酸序列與*F.noatunensis* subsp. *orientalis* strain序列最為相近 (相似度 identities = 100 %)。(圖7、圖8、圖9)

八、類症鑑別

1. 奴卡氏菌症 (Nocardiosis)：

奴卡氏菌可感染的魚種非常廣泛，不管是海水魚或是淡水魚，都有其感染病例。*Nocardia asteroides*, *N. seriolae* (之前稱為*N. kampfii*), *N. salmonicida* and *N. crassostreae*等皆曾自感染魚臟器分離出 [7]。臨床上可見病魚典型病變為皮膚潰瘍，在鰓部、腎臟、心臟、肝臟、及脾臟形成肉芽腫病變，骨骼肌局部壞死，以Fite抗酸染色，可見呈現弱陽性反應串珠樣或分枝狀長桿菌。

2. 分枝桿菌症 (Mycobacteriosis)：

不論是海水魚或淡水魚均會感染分枝桿菌，目前文獻指出超過160種的魚類發生感染，引起魚類感染的分枝桿菌有*Mycobacterium marinum*, *M. chelonae piscarium*, *M. fortuitum*, *M. anabanti*, *M. neoaurum*, *M. poriferae*, *M. scrofulaceum*, *M. shottsii*, *M. gordonae*, *M. pseudoshottsii*, *M. piscium*, *M. platypoecilus*等。上述幾種亦會造成人類皮膚或全身性的感染。在肉眼觀察時，可見體表的出血或潰瘍，多重器官尤其是脾臟及腎臟的白色肉芽腫病變。病理組織切片下亦可發現內臟有多發性肉芽腫病變，但型態與弗朗西斯氏菌感染所造成之肉芽腫病變略有不同，以Ziehl-Neelsen抗酸染色可見陽性抗酸分枝桿菌存在 [2]。

3. 發光桿菌症 (Photobacteriosis)：

發光桿菌普遍存在於海洋環境中和海洋生物體的體表，造成魚隻感染的病原以*Photobacterium damsela*最為人所熟知，慢性感染魚隻的臟器表面，尤其是脾臟及腎臟，可見多發灰白色肉芽腫病變，細菌可自感染魚隻分離出，經革蘭氏染液染色後可見具兩端濃染的陰性桿菌。

4. Piscirickettsiosis：

*Piscirickettsia salmonis*早期一直誤將此病原菌歸類為立克次體，後經由基因序列的比對，現在重新將其歸類在Gammaproteobacteria綱Thiotrichales目Piscirickettsiaceae科Piscirickettsia屬salmonis種。本病原菌

主要感染海水鮭魚，部分魚隻剛開始體表出現白色小壞死點，後逐漸變為潰瘍，在慢性嚴重感染的病例，可見到腹水，脾臟及腎臟腫大，肝臟顏色較蒼白且有多發乳白色結節。組織病理切片下可在脾臟及腎臟的間質看到肉芽腫炎症反應導致造血細胞的流失，因此臨床上常看到感染 *Piscirickettsia salmonis* 的魚隻有貧血的狀況 [5]。

5. 非典型癰瘡病 (Atypical furunculosis)：

造成感染的病原菌為 *atypical Aeromonas salmonicida*，在肉眼觀察下，此病的臨床病變與弗朗西斯氏菌症非常的相似，厭食、高死亡率及皮膚潰瘍，還有脾臟、腎臟及心臟的肉芽腫病變，但只要做組織學的檢查，即可與弗朗西斯氏菌症區別。非典型癰瘡病和弗朗西斯氏菌也有合併感染的病例出現[4] [11]。

九、最終診斷

本病例依據臨床症狀、實驗室檢驗、組織病理變化及分子生物學檢測結果，最終診斷為 *F. noatunensis* subsp. *orientalis* 感染引起之弗朗西斯氏菌症。

十、處理與預防

1. 弗朗西斯氏菌在極低劑量即具感染力，且其傳染力高，發病率高，死亡率也高，種種的因素導致抗菌劑的治療效果差，但仍有研究顯示連續10-14天使用Oxytetracycline 30-50 mg/Kg治療，可有效治療弗朗西斯氏菌症。另也有使用Tetracycline治療成功的案例 [4]。
2. 依據Birkbeck等報告 [3] 引述對弗朗西斯氏菌的抗菌劑敏感性實驗結果如下：
有效抗菌劑為Ceftazidime, Tetracycline, Gentamycin, Ciprofloxacin, Florfenicol，無效抗菌劑則為Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Penicillin, Ampicillin, Cefuroxime, Erythromycin，部分有效抗菌劑為Oxolinic acid。
依據我國水產動物用藥品使用規範，針對上述抗菌劑敏感性實驗結果，只能推薦使用Florfenicol來控制疫情。但一般現場用藥，考慮經濟價值及抗藥性，仍以推薦使用Oxytetracycline搭配BKC藥浴為主。
3. 目前無商品化疫苗，埤圳養殖預防困難。

十一、疫情追蹤調查

本次疫情爆發後，為瞭解弗朗西斯氏菌於轄區埤圳內感染情形及範圍，本所於6月至8月間對湖口灌區轄內之光復圳及相關上游之桃園大圳發生場進行現場訪視及附近埤圳是否有本病感染之調查。

1. 光復圳共有12支線，65個陂塘，灌區面積有3,886公頃。本所針對本次感染區域內之埤圳共計調查9個支線，25個陂塘。調查結果如下：

光復圳

- 1支線共有4池：1-2池為發病池，1-3及1-4皆有感染。
- 2支線共有10池：2-2池為發病池，2-3及2-9皆有感染。
- 3支線共有2池：3-1池為發病池，3-2皆有感染。
- 4支線共有3池：4-2池為發病池，4-3有感染。
- 5支線共有5池：5-1池為正常，5-2池為發病池，5-3及5-5皆有感染。
- 6支線共有3池：6-1池為發病池，6-2及6-3皆有感染。
- 8支線共有17池：8-4池及8-11池為正常，8-12池為發病池，8-13及8-17皆有感染。
- 9支線共有3池：9-2池為發病池，9-3池也有感染。

新豐和興線 共有2池皆為發病池

97至100年間的3至4月及10至11月皆出現臨床症狀造成死亡。

因光復圳承接桃園大圳之尾水，故對桃園大圳12支線末端池進行採樣檢驗。

12支線共有20池：12-2池為發病池，12-6池亦有感染

2. 本所於6至8月的疫情調查中，另針對曾發病且大量死亡的埤圳進行採樣，共計25場。

檢驗剖檢魚隻，10場無肉眼病變，15場後腎可見少量結節，而這25場於組織切片下皆可見肉芽腫病變。

十二、討論

弗朗西斯氏菌 (*Francisella* spp.) 目前歸類於 *Bacteria* 界、*Proteobacteria* 門、*Gammaproteobacteria* 綱、*Thiotrichales*

目、*Francisellaceae*科、*Francisella*屬，是一種絕對需氧、兼性細胞內寄生、無運動性、革蘭氏陰性、球桿狀菌，具有微弱的catalase正反應，oxidase負反應。本菌感染的自然宿主非常廣泛，包括多達200多種的哺乳動物(包括人類)、鳥類、兩棲類、甲殼類及壁蝨等。在環境中的土壤、水也可分離到本菌。它可引起急性到慢性的病症。依據最新的分類，目前弗朗西斯氏菌可分為3個種，分別為 *F. tularensis*、*F. philomiragia*及 *F. hispaniense*，其中最為人所熟知的病原菌為 *F. tularensis*，是引致兔熱病的病原，也是重要的人畜共通傳染病原，有發展為可怕生化武器的潛能。能造成魚類疾病之主要病原菌為 *F. philomiragia*種的亞種，*F. noatunensis* subsp. *noatunensis*及 *F. noatunensis* subsp. *orientalis*，前者主要感染冷水域的鱈魚、鮭魚而後者主要感染溫暖水域的吳郭魚 [4]。弗朗西斯氏菌症在魚類被認為是新興疾病的原因，是之前一直無法由病魚分離到病原，這是因為 *F. noatunensis* subsp. *noatunensis*及 *F. noatunensis* subsp. *orientalis*對培養基極為挑剔，無法由實驗室常規使用的培養基培養分離，直到Hsieh等 (2006) [6]發表在臺灣海水及淡水吳郭魚分離到病原菌並確認其為弗朗西斯氏菌後，陸續在拉丁美洲的哥斯大黎加、美國、英國、印尼均有吳郭魚的確診病例；另外其他品種如加州雜交的條紋鱸、日本三線磯鱈也有感染的案例 [4]。最近甚至發現感染軟體動物-鮑魚的病例 [3]。

雖然報告指出 *F. noatunensis* subsp. *orientalis*可感染其他數種魚種如三線磯鱈及一些觀賞慈鯛科魚，但在接種實驗中，吳郭魚腹腔注射23 cfu的菌量即可造成死亡，相對於斑馬魚注射 3.45×10^5 cfu的菌量僅造成極低的死亡率，可說明其具有一定的宿主專一性。目前由魚類分離出的弗朗西斯氏菌均無法在35 °C的溫度下生長，且實驗指出將 $5-7 \times 10^7$ cfu的菌量注射到實驗鼠的腹腔，並沒有造成實驗鼠的感染，也沒有自實驗鼠臟器分離到細菌，因此推斷造成魚類感染的弗朗西斯氏菌並不會造成人畜共通傳染病。此外吳郭魚的背鰭具有尖刺，依目前吳郭魚感染弗朗西斯氏菌盛行率這麼高的情況下，藉由抓魚時被刺傷的傷口將弗朗西斯氏菌傳染給人的病例應該會很多，但目前並沒有此種個案出現，再次證明感染魚的弗朗西斯氏菌並非人畜共通傳染病 [4]。

絕大部分的弗朗西斯氏菌無法生長於一般實驗室常規使用的培養基上，這當中也包涵了造成魚類感染的菌種，額外添加氨基酸cystein的培養基才有辦法幫助其生長。*F. noatunensis* subsp. *orientalis*的生長速度緩慢，一般培養在Thayer-Martin agar上於23 °C下需要3至6天。生長之菌落呈現光滑灰白色色澤。最適合之生長溫度介於23至28 °C，無法於35 °C以上生長 [1]。在低於適合細菌生長溫度的溫度時，即使感染病原菌，也不會造成感染魚的死亡。有實驗指出 *F. noatunensis*在經過8-12 °C的環境下16-30天，可轉變成休眠但無毒力的狀態 [4]。以上與本所統計98年至100年6月的送檢確診病例時間點相符合(圖10)。本所病例以3至5月及11至12月這5個月為發病高峰期，此時期埤圳的水溫大約為25至27 °C，為弗朗西斯氏菌的最適生長溫度，在1、2月份水溫過冷，7、8、9月份水溫過高，死亡遂逐漸停止。而針對發病場採樣檢驗結果，肉眼病變消失或僅後腎有少量結節，組織切片下皆可見肉芽腫病變，這也與文獻指出弗朗西斯氏菌在非最適溫度時呈現休眠的狀況符合。

弗朗西斯氏菌的傳播必須藉由直接接觸的方式如接觸感染動物、污染的水或食物及蚊蟲叮咬等，但對於魚類，無須所謂的直接接觸，其生存的環境一水即是一個非常好的傳播途徑，只要有適當的溫度及相關環境因子的配合，即可造成大規模的感染。有實驗顯示，將魚隻放置於含病原菌的水體中，10天後有80 %的死亡率，病變和自然感染的病變相同 [7]。另一實驗顯示，將腹腔注射病原菌的感染魚隻放置於實驗池中73天後，即造成原池中50 %的魚隻感染死亡 [3]。以上文獻結果亦與本所針對湖口灌區轄內之光復圳及桃園大圳發生場及相關下游埤圳感染之調查結果相符合，這也說明了為什麼弗朗西斯氏菌現在如此普遍存在於臺灣各養殖池。

目前對於弗朗西斯氏菌的感染及傳播機制尚未非常的瞭解，且並不是所有的感染魚隻都有臨床上或組織學上的病變，而常規使用的培養基又無法分離培養到此菌，因此還有很多潛藏的感染場尚未被發現。隨著環境的變遷，野外捕捉的魚量巨幅減少當中，養殖漁業勢必成為未來魚貨的重要來源，而弗朗西斯氏菌症造成吳郭魚產業嚴重的經濟損失，已逐漸受到各界的重視。現尚未有疫苗或藥物有效的預防及控制弗朗西斯氏菌症，若能針對本病發展一套有效的監測方法或疫苗來預防此病發生，將會是吳郭魚養殖業者的最大福音。

十三、致謝

本病例報告承蒙行政院農業委員會家畜衛生試驗所涂堅組長、蔡佳錚助理研究員、國立臺灣大學獸醫專業學院水生動物疾病研究室陳燉玖副教授、毒物病理免疫學研究室邱慧英獸醫師等之協助與指導，謹此致謝。

十四、參考文獻

- 1.謝嘉裕。慈雕科魚類法朗西斯樣菌感染症之研究。國立屏東科技大學博士論文。2006。
- 2.謝嘉裕。分枝桿菌感染症。水生動物疾病診斷系統網站。行政院農業委員會家畜衛生試驗所。

3. Birkbeck TH, Feist SW, Verner-Jeffreys DW *Francisella* infections in fish and shellfish. *J Fish Dis* 34 : 173-187, 2011.
4. Colquhoun DJ, Duodu S *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Veterinary Research* 42 : 47, 2011.
5. Fryer JL, Hedrick RP *Piscirickettsia salmonis* : a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *J Fish Dis* 26 : 251-262, 2003.
6. Hsieh CY, Tung MC, Tu C, Chang CD, Tsai SS Enzootic of visceral granulomas associated with *Francisella*-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture* 254 : 129-138, 2006.
7. Labrie L, Ng J, Tan Z, Komar C, Ho E, Grisez L Nocardial infections in fish: an emerging problem in both freshwater and marine aquaculture systems in Asia. *Diseases in Asian Aquaculture* VI 297-312, 2008.
8. Jeffrey KR, Stone D, Feist SW, Verner-Jeffreys DW An outbreak of disease caused by *Francisella* sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. *Dis Aquat Organ* 91 : 161-165, 2010.
9. Nylund A, Ottem KF, Watanabe K, Karlsbakk E, Krossoy B *Francisella* sp. (Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. *Arch Microbiol* 185 : 383-392, 2006.
10. Soto E, Hawke JP, Fernandez D, Morales JA *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) , in Costa Rica. *J Fish Dis* 32 : 713-722, 2009.
11. The health situation in Norwegian aquaculture. The National Veterinary Institute : 22-25, 2008.



圖1 鰓絲、頭腎及肝臟腫脹，皆可見密發大小不一白色結節

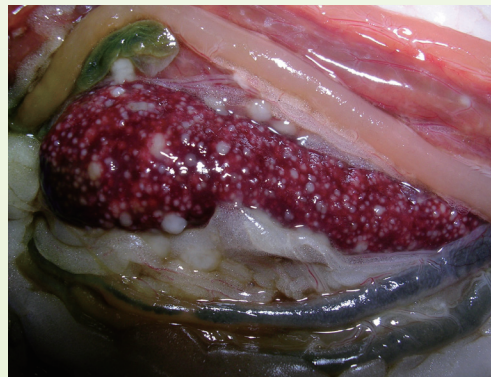


圖2 脾臟腫大，密發大小不一白色結節

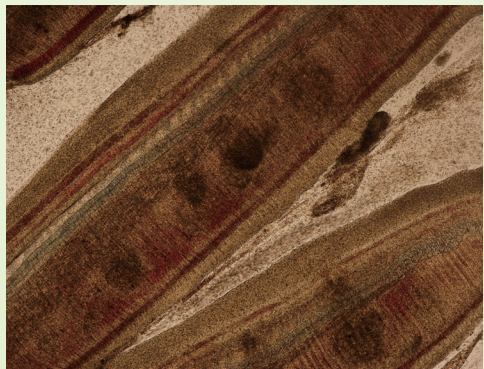


圖3 鰓絲壓片可見黏液增生及多發類結節樣物 (100X)

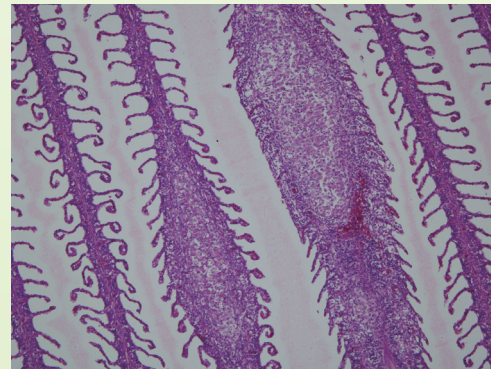


圖4 初級鰓薄板多發壞死灶，病灶區可見大量巨嗜細胞浸潤 (H & E stain, 100X)

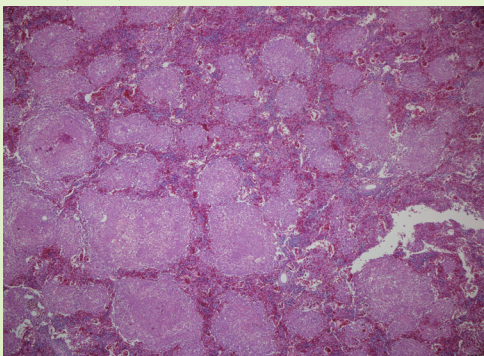


圖5 脾臟多發壞死性肉芽腫 (H & E stain, 40X)

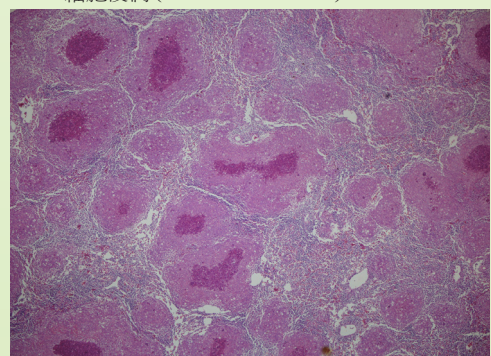


圖6 頭腎多發壞死性肉芽腫 (H & E stain, 40X)

286 bp

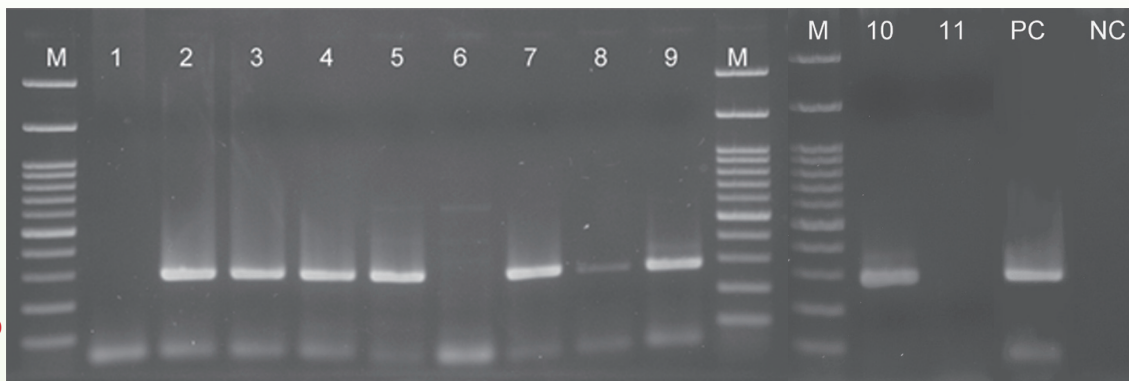


圖7 PCR產物電泳圖 (M: 100 bp marker、Lane 1-11 本所病例檢體、PC: 陽性對照、NC: 陰性對照)

		PercentIdentity											
Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
	1	■	100.0	100.0	100.0	98.2	98.6	94.7	94.7	93.6	98.2	1	5
	2	0.0	■	100.0	100.0	98.2	98.6	94.7	94.7	93.6	98.2	2	9
	3	0.0	0.0	■	100.0	98.2	98.6	94.7	94.7	93.6	98.2	3	10
	4	0.0	0.0	0.0	■	98.2	98.6	94.7	94.7	93.6	98.2	4	
	5	1.8	1.8	1.8	1.8	■	98.6	94.7	94.7	94.0	98.2	5	
	6	1.4	1.4	1.4	1.4	0.4	■	95.1	95.1	94.3	98.6	6	
	7	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.1	■	99.6	95.8	94.4	7	
	8	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.1	0.4	■	95.4	94.4	8	
	9	5.6	5.6	5.6	5.6	5.2	4.8	3.3	3.7	■	93.6	9	
	10	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	0.7	5.1	5.1	4.9	■	10	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

本所病例檢體

Francisella noatunensis subsp. oriental
Francisella philomiragia subsp. noatune
Francisella piscicida
Francisella tularensis strain
Francisella tularensis subsp. novicida
Wolbachia persica
Francisella philomiragia strain

圖8 本所病例Francisella 陽性樣本與各參考株之序列相似度。使用DNASTarMegAlign軟體比對16 S部分基因序列 (核苷酸180-465)。

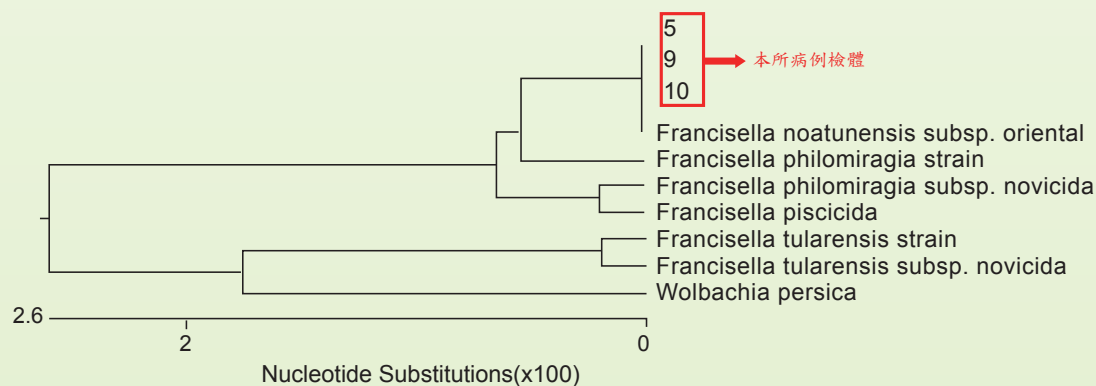


圖9 親源分析樹狀圖。將16 S部分基因序列經NCBI基因庫比對之結果。

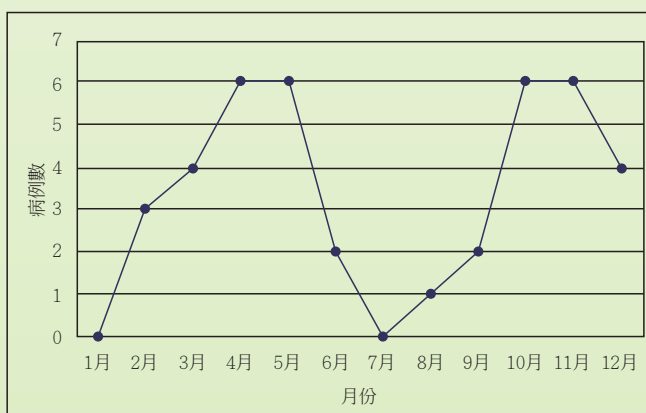


圖10 統計本所98至100年弗朗西斯氏菌症發病場數與發生季節 (溫度) 關係圖